

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re U.S. Patent Application of)
)
TAKESHITA et al.)
)
Application Number: To be Assigned)
)
Filed: Concurrently Herewith)
)
For: METHOD FOR GPCR ASSAY WITH A)
COEXPRESSED G α PROTEIN)
)
ATTORNEY DOCKET NO. HIRA.0141)

Honorable Assistant Commissioner
for Patents
Washington, D.C. 20231

**REQUEST FOR PRIORITY
UNDER 35 U.S.C. § 119
AND THE INTERNATIONAL CONVENTION**

Sir:

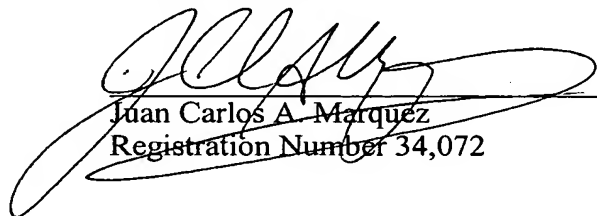
In the matter of the above-captioned application for a United States patent, notice is hereby given that the Applicant claims the priority date of June 13, 2003, the filing date of the corresponding Japanese patent application 2003-170032.

A certified copy of Japanese patent application 2003-170032 is being submitted herewith. Acknowledgment of receipt of the certified copy is respectfully requested in due course.

Respectfully submitted,

Stanley P. Fisher
Registration Number 24,344

REED SMITH LLP
3110 Fairview Park Drive
Suite 1400
Falls Church, Virginia 22042
(703) 641-4200
February 10, 2004



Juan Carlos A. Marquez
Registration Number 34,072

(Translation)

JAPAN PATENT OFFICE

This is to certify that the annexed is a true copy of
the following application as filed with this Office.

Date of Application: June 13, 2003
Application Number: Japanese Patent Application
No. 2003-170032
Applicant(s): Hitachi, Ltd.

December 16, 2003

Commissioner,
Japan Patent Office Yasuo Imai (seal)

Certificate No. 2003-3104492

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2 0 0 3 年 6 月 1 3 日

出 願 番 号
Application Number: 特 願 2 0 0 3 - 1 7 0 0 3 2
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 3 - 1 7 0 0 3 2]

出 願 人
Applicant(s): 株式会社日立製作所

2 0 0 3 年 1 2 月 1 6 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 2003年 6月13日
Date of Application:

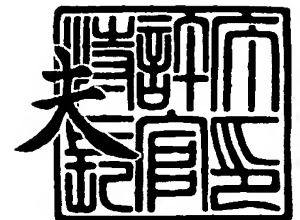
出願番号 特願2003-170032
Application Number:
[ST. 10/C]: [JP 2003-170032]

出願人 株式会社日立製作所
Applicant(s):

2003年12月16日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井 康



出証番号 出証特2003-3104492

【書類名】 特許願

【整理番号】 H300343

【提出日】 平成15年 6月13日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 G01N 33/50

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都千代田区神田駿河台四丁目 6 番地 株式会社 日立製作所 ライフサイエンス推進事業部内

 【氏名】 竹下 智子

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都千代田区神田駿河台四丁目 6 番地 株式会社 日立製作所 ライフサイエンス推進事業部内

 【氏名】 大友 純

【特許出願人】

 【識別番号】 000005108

 【氏名又は名称】 株式会社 日立製作所、

【代理人】

 【識別番号】 100091096

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 平木 祐輔

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 015244

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

 【物件名】 明細書 1

 【物件名】 図面 1

 【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 $G\alpha$ 蛋白質共発現によるGPCR計測方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 G 蛋白質共役受容体 (GPCR) をコードする遺伝子、及び $Gq\alpha$ 若しくは $G_{11}\alpha$ と、 $G_{14}\alpha$ 、 $G_{15}\alpha$ 若しくは $G_{16}\alpha$ とのキメラ蛋白質である $Gq\alpha$ サブユニットをコードする遺伝子を動物細胞に発現させることを特徴とする、外来蛋白質発現細胞の作製方法。

【請求項 2】 キメラ蛋白質の N 末端側が Gq または G_{11} 由来の配列であり、C 末端側が G_{14} 、 G_{15} または G_{16} 由来の配列であることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】 GPCR をコードする遺伝子を導入してから、12～36 時間後に $Gq\alpha$ サブユニットをコードする遺伝子を導入する、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】 $Gq\alpha$ サブユニットをコードする遺伝子の量が、GPCR をコードする遺伝子の量に対し、1/10～10 の比であることを特徴とする、請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】 請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載の方法によって作製される、外来蛋白質発現細胞。

【請求項 6】 請求項 5 に記載の外来蛋白質発現細胞におけるイノシトールリン脂質代謝回転系の活性化を測定することを特徴とする、GPCR を介したシグナル伝達系の活性化を測定する方法。

【請求項 7】 細胞内 Ca イオン濃度の上昇を測定する、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】 細胞内 Ca イオン濃度の上昇の指標として Ca イオン濃度依存性 Cl 電流変化を測定する、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】 特定の GPCR を発現する請求項 5 に記載の外来蛋白質発現細胞を販売または譲渡する方法。

【請求項 10】 $Gq\alpha$ 若しくは $G_{11}\alpha$ と、 $G_{14}\alpha$ 、 $G_{15}\alpha$ 若しくは $G_{16}\alpha$ とのキメラ蛋白質 α サブユニットをコードする遺伝子を販売または譲渡する方法。

【請求項 11】 キメラ蛋白質のN末端側がGqまたはG₁₁由来の配列であり、C末端側がG₁₄、G₁₅またはG₁₆由来の配列である、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】 被験物質を請求項 5 に記載の外来蛋白質発現細胞と接触させることを特徴とする、GPCRに対するリガンドのスクリーニング方法。

【請求項 13】 顧客の要請に応じて請求項 5 に記載の外来蛋白質発現細胞を作製し、該細胞で発現するGPCRに対するリガンドをスクリーニングし、得られた解析データを顧客に提供することを特徴とする、GPCRに対するリガンドのスクリーニングサービス方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明はアフリカツメガエル卵母細胞等の動物細胞を用いたG蛋白質共役受容体（以下、GPCRという）を介したシグナル伝達活性の測定方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

ヌクレオチドの一種であるGDPもしくはGTPと特異的に結合するGTP結合蛋白質の中で、細胞外情報物質（アゴニスト）が結合する細胞膜上の受容体であるGPCRと共役して細胞内へのシグナル伝達・増幅機能を有するものはG蛋白質と呼ばれている。GPCRへのアゴニストの結合によって活性化されるG蛋白質は α 、 β 、 γ サブユニットからなる三量体を形成していることから、三量体G蛋白質とも呼ばれている。G蛋白質は、機能等の違いにより、Gs、Gi、Go、Gq、Gt、Golf等のいろいろなサブタイプが存在する。例えば、GPCRの1種であるロドプシンによって活性化されるG蛋白質はGt、あるいはトランスデューシンと呼ばれる場合がある。Gqサブタイプには更に、動物種によって呼称は様々であるが、例えばGq、G₁₁～G₁₆と呼ばれる種類があることが知られている。G蛋白質の α サブユニットの機能を検討するために、これらG₁₁～G₁₆間でキメラ蛋白質を作製する試みがされている（例えば非特許文献1等）。一方、公知のGPCRとしては、H1～2受容体、M1～M5受容体、 δ オピオイド受容体、mGlu1受容体、ロドプシン等が知られている。

。

【0003】

従来、アフリカツメガエル卵母細胞や動物培養細胞による発現系を用いて、GPCRを介したシグナル伝達活性を測定することが行われていたが、その際、GPCRと共役するG蛋白質のサブタイプに応じてその測定手法を変える必要があった。アフリカツメガエル卵母細胞を用いた測定系を例に説明すると、GqサブタイプのG蛋白質と共役するGPCRでは、Caイオン濃度依存性Cl⁻電流変化を指標として測定することが可能であるが、Giサブタイプのものでは、細胞内cAMP濃度イオン依存性のKチャンネル活性を指標として測定することが必要である。

【0004】

【非特許文献】

Koji Nakamuraら、「ジャーナル オブ バイオケミストリー (Journal of Biochemistry)」、1996年、120巻、p.996-p.1001

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

上記のように、測定しようとするシグナル伝達系におけるG蛋白質のサブタイプが既知であるときには、そのサブタイプに応じた測定方法を採用することにより、対応可能である。しかし、近年のヒトゲノム計画の進行により、塩基配列またはアミノ酸配列の情報からGPCRであることが示唆される蛋白質が多数見つっている。これらの機能を確認するには、リガンド候補物質がそのGPCRと推定される蛋白質を介してシグナル伝達系を活性化させるかどうかを測定することが必要である。この場合、配列のみの情報からは確認対象となる系におけるG蛋白質のサブタイプは通常不明なため、従来法で活性を確認するには、1つのリガンドに対して複数の測定方法を試みる必要があり、手間がかかるものであった。換言すれば、単一の測定方法のみを用いれば、GPCRにアゴニストが結合したとしても、測定方法が不適當である場合には活性化を検出することができず、偽陰性の結果を生じてしまうことになる。

【0006】

【課題を解決するための手段】

本発明は、天然においてGPCRと共役するG蛋白質のサブタイプが不明である場

合にも、そのGPCRを介したシグナル伝達系の活性化を測定する単一の方法を開発すべく検討した結果達成されたものであって、アフリカツメガエル卵母細胞等の動物細胞にGPCRと共に特定のG蛋白質を共発現する方法を提供するものである。

【0007】

具体的には、本発明は、G蛋白質共役受容体 (GPCR) をコードする遺伝子、及びGq α 若しくはG₁₁ α と、G₁₄ α 、G₁₅ α 若しくはG₁₆ α とのキメラ蛋白質であるGq α サブユニットをコードする遺伝子を動物の卵母細胞に導入することを特徴とする、外来蛋白質発現細胞の作製方法を提供する。

【0008】

本発明において用いるGPCRとしては、特に限定するものではないが、例えばH1～2受容体、M1～M5受容体、 δ オピオイド受容体、mGlu1受容体等が挙げられる。GPCRをコードする遺伝子は、例えばGenBank等のデータベースから塩基配列情報を入手し、それに基づいて定法により化学合成することによって得ることができる。遺伝子としては、RNA及びDNAのいずれでも良く、また導入する宿主における翻訳効率を高めるために当分野で通常行われるように適宜改変することもできる。

【0009】

GPCRと共発現させるGq α サブユニットをコードする遺伝子も、上記と同様にし化学合成することによって得ることができる。本発明においては、Gq α サブユニットは、Gq α 若しくはG₁₁ α と、G₁₄ α 、G₁₅ α 若しくはG₁₆ α とのキメラ蛋白質とすることが必要である。キメラ蛋白質の構成は、特に限定するものではないが、例えばキメラ蛋白質のN末端側をGqまたはG₁₁由来の配列とし、C末端側をG₁₄、G₁₅またはG₁₆由来の配列とすることが好ましい。例としてG₁₁ α サブユニットとG₁₄ α サブユニットのキメラG α 蛋白質の構成を図1に示す。G α サブユニットは、全長約三百数十個のアミノ酸からなり、そのN末端に $\beta\gamma$ サブユニットとの作用部位、C末端に受容体結合部位が存在することが知られている。本発明者等が種々検討した結果、G₁₁ α サブユニットとG₁₄ α サブユニットのキメラG α 蛋白質としては、N末端側から4分の1～2分の1までをG₁₁ α 由来の配列とし、それからC末端までをG₁₄ α 由来の配列とすることが特に有効であることが確認された。

【0010】

上記遺伝子を導入して外来蛋白質を発現させる動物細胞としては、株化細胞、昆虫細胞、アフリカツメガエル等の卵母細胞が挙げられ、特に限定するものではない。GPCRを動物細胞に発現させ、その機能を調べる、リガンド等を探索するという方法は当分野において一般的であり、多くの成書がある（例えば、「最先端創薬」（長尾 拓ら編、共立出版） 第821-826頁「オーファン受容体」；「シグナル伝達実験法」（宇井 理生編、羊土社） 第3章 第54-73頁「受容体分子の解析」）が、入手し易く、操作も容易である等の理由から、アフリカツメガエル卵母細胞を使用するのが特に好ましい。

【0011】

動物細胞への遺伝子の導入は、当分野で通常行われている方法を適宜利用可能であるが、試料導入用の針を用いて自動または手動でマイクロインジェクションすることが確実であり好ましい。遺伝子導入は、同時に行っても良いが、GPCRをコードする遺伝子を導入してから、12~36時間後にGq α サブユニットをコードする遺伝子を導入すると応答が増大し、特に好ましい。

【0012】

またGq α サブユニットをコードする遺伝子の量は、GPCRをコードする遺伝子の量に対し、1/10~10の比であるのが好ましく、アフリカツメガエル卵母細胞の場合には、GPCRをコードする遺伝子を1~10 ngの範囲とし、Gq α サブユニットをコードする遺伝子の量を1~10 ngの範囲とすると良好な結果を得ることができる。

GPCR遺伝子の導入後、1~3日間培養することで、上記2種の外来蛋白質が発現した卵母細胞を得ることができる。

【0013】

上記のようにして得られた外来蛋白質発現卵母細胞を使用して、イノシトールリン脂質代謝回転系の活性化を測定することにより、リガンド結合によって引き起こされるGPCRを介したシグナル伝達系の活性化を測定することができる。イノシトールリン脂質代謝回転系について、図2に模式図として示す。GPCR及びキメ

ラ α サブユニット（図中では G_X ）を発現させた卵母細胞をリガンドで刺激する。リガンドが受容体に結合すると、三量体であったG蛋白質が $G\alpha$ サブユニットと $G\beta G\gamma$ サブユニットに解離する。この解離のシグナルを受けて、酵素PLCが活性化し、細胞膜のリン脂質であるPIP2を分解する。この反応の結果、InsP3が産生される。InsP3は細胞内の粗面小胞体（ER）のInsP3に結合し、細胞内にCaを動員させる。その結果、細胞内Ca濃度が上昇し、細胞内Ca濃度依存性Clチャンネルを開口させる。

【0014】

測定方法としては、Gq蛋白質の活性化を測定し得る方法であれば良く、例えば蛍光法による細胞内Caイオン濃度上昇測定や、細胞内Caイオン濃度上昇の指標としてCaイオン濃度依存性Cl電流変化を用いる方法等を使用することができる。本発明により、いかなるGPCRに結合するリガンドであっても、単一の測定方法で被験物質がリガンドか否かを判断することが可能である。本発明の測定方法について、図3に模式的に示す。GPCR及びキメラ α サブユニットをコードするRNAを*in vitro*で合成し、マイクロインジェクションによって卵母細胞に導入する。リガンドの結合によってGPCRを介したシグナル伝達系が活性化され、その結果、上記のようにCa依存性Clイオンチャンネルが開口して塩素イオンの放出が生じ、細胞内外の電位差に変化（電流応答）が生じるため、これをガラス電極を用いて検出することによって、リガンドに対する応答の有無、すなわちリガンド結合による活性化の有無を測定することができる。

【0015】

測定の際には、リガンド候補である被験物質を上記外来蛋白質発現卵母細胞と接触させ、その結果、例えばCaイオン濃度依存性Cl電流応答が生じるか否かを検出する。その際、特定のGPCRを発現させた卵母細胞のみを使用しても良く、また、複数種のGPCRについて上記外来蛋白質発現卵母細胞を作製し、並行して測定を行うこともできる。

【0016】

本発明はまた、特定のGPCRを発現する上記本発明の外来蛋白質発現細胞を販売または譲渡する方法を提供する。この場合、特定の1種のGPCRを発現する卵母細胞

胞のみを販売または譲渡しても良いが、複数のGPCRについて細胞を作製し、それらをセットとして合わせて販売または譲渡しても良い。その際、導入した遺伝子の種類、導入日時等の情報を、例えば情報を記したラベルの形で細胞に添付して販売または譲渡することができる。

【0017】

あるいはまた、Gq α 若しくはG₁₁ α と、G₁₄ α 、G₁₅ α 若しくはG₁₆ α とのキメラ蛋白質 α サブユニットをコードする遺伝子を販売または譲渡する方法も提供する。キメラ蛋白質は、特に限定するものではないが、N末端側がGqまたはG₁₁由来の配列であり、C末端側がG₁₄、G₁₅またはG₁₆由来の配列であることが好ましい。この遺伝子は、上記のように、GPCRをコードする遺伝子と共に動物細胞に導入することで、これらの遺伝子を発現する細胞を作製し、リガンド結合によって活性化されるGPCRを介したシグナル伝達を測定するために使用することができる。

【0018】

本発明はまた、上記のように、各種被験物質と上記外来蛋白質発現細胞とを接触させることによって、リガンドをスクリーニングする方法を提供する。

スクリーニングは、上記販売または譲渡された外来蛋白質発現細胞を用いて、あるいは上記販売または譲渡された遺伝子を用いて作製された外来蛋白質発現細胞を用いて行うことができる。

【0019】

あるいはまた、顧客の要請に応じて上記外来蛋白質発現細胞を作製し、該細胞で発現するGPCRに対するリガンドをスクリーニングし、得られた解析データを顧客に提供することを特徴とする、GPCRに対するリガンドのスクリーニングサービスとして実施することもできる。

本発明のスクリーニング方法により、機能未知のGPCRのリガンドを同定する際の測定方法を単純化・高速化することができる。

【0020】

【発明の実施の形態】

以下、本発明について実施例を挙げて更に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

【0021】

実施例 1

GPCRとして、H1～2受容体、M1～M5受容体、 δ オピオイド受容体、及びmGlu1受容体を用い、またG蛋白質の例としてG₁₁蛋白質とG₁₄蛋白質を用いて、アフリカツメガエル卵母細胞における共発現を行った。H1受容体の遺伝子は、Biochem. Biophys. Res. Commun. 201(2), 894-901 (1994)等に記載の配列情報（配列番号1）に基づいてPCR法を用いたクローニングにより取得した。H2受容体の遺伝子は、FEBS Lett. 451(3), 327-331(1999)等に記載の配列情報（配列番号2）に基づいてPCR法を用いたクローニングにより取得した。その他の遺伝子は、東京都精神医学研究所 額田敏秀博士より入手した。GPCRを介したシグナル伝達の測定方法としてCa濃度イオン依存性Clイオン電流測定を用いるが、本発明は必ずしもこの測定方法に限定されるものではない。

【0022】

メスアフリカツメガエルより摘出し、定法により卵母細胞を選別した。選別後の卵母細胞にH1～2受容体、M1～M5受容体、 δ オピオイド受容体、またはmGlu1受容体をコードするin vitro合成したRNAと共に、同様に合成したG₁₁蛋白質 α サブユニットとG₁₄蛋白質 α サブユニットのキメラG α 蛋白質をコードするRNAを遺伝子導入した。またコントロールとしてキメラG α 蛋白質のRNAを導入しない卵母細胞も作製した。その後、卵母細胞を培養した。

【0023】

培養した卵母細胞を2電極膜電位固定法により-60mVに膜電位固定した。それぞれの遺伝子を導入した卵母細胞に、図4に示すように、GPCRの型に応じてヒスタミン、アセチルコリン、Leu-Enk、またはグルタミン酸をリガンドとして添加し、その際のCaイオン濃度依存性Cl電流応答の有無を測定した。

【0024】

その結果、本来受容体と共役するG蛋白質がG_qサブタイプであるGPCRのH1、M1、M3、M5、及びmGlu1受容体に関しては、キメラ蛋白質の共発現の有無に関わらず電流応答が得られたが、本来共役する受容体がG_sやG_iサブタイプである場合（H2、M2、M4、及び δ オピオイド受容体）は、キメラ蛋白質を共発現させた場合に

のみ電流応答が得られた。なお、G₁₁蛋白質単体やG₁₆蛋白質単体を共発現させた場合には、このような効果は見られなかった。

【0025】

実施例2

実施例1で記述した方法を用いて、リガンド濃度と電流応答の関係について調べた。(1) H2受容体と、G₁₁αサブユニットとG₁₄αサブユニットのキメラGα蛋白質とを発現する卵母細胞、(2) M1受容体と、G₁₁αサブユニットとG₁₄αサブユニットのキメラGα蛋白質とを発現する卵母細胞、(3) M2受容体と、G₁₁αサブユニットとG₁₄αサブユニットのキメラGα蛋白質とを発現する卵母細胞、は実施例1と同様の方法で作成した。

【0026】

実施例1記載の方法にて各濃度のリガンド(H2;ヒスタミン、M1/4;ACH)刺激による電流応答を測定した。その結果、H2受容体、M1受容体、M4受容体の例について図5に示した。この結果、キメラ蛋白質を共発現させた場合も、リガンド濃度と電流応答の大きさに相関関係があることが示された。尚、本来共役するG蛋白質がGqであるM1受容体(2)においては、キメラGα蛋白質の共発現の有無による電流応答で有意な差は見られず、外来G蛋白質の発現によって応答性に影響がないことも確かめられた。

【0027】

実施例3

GPCRとしてH2受容体、導入する外来G蛋白質としてG₁₁αサブユニットとG₁₄αサブユニットのキメラGα蛋白質を用い、遺伝子導入のタイミングによる電流応答に対する影響を検討した。

【0028】

H2受容体をコードするRNAを卵母細胞に導入すると同時、あるいはその24時間後にG₁₁αサブユニットとG₁₄αサブユニットのキメラGα蛋白質をコードするRNAを導入した。その後、実施例1に記載の方法で、これらの卵母細胞のリガンド応答を測定した。リガンドには10μMヒスタミンを用いた。その結果、図6に示すように、GPCRをコードする遺伝子を導入してから24時間後にキメラGqαサブユニ

ットをコードする遺伝子を導入した場合、同時に双方の遺伝子を導入した場合に比べ、ヒスタミンによる電流応答が増大した。

【0029】

また図7に、GPCRをコードする遺伝子導入後0～42時間後にGq α サブユニットをコードする遺伝子を導入した場合の電流応答の結果を示す（導入後0時間は同時に導入した場合）。図7に示すように、GPCRをコードする遺伝子を導入してから、12～36時間後にGq α サブユニットをコードする遺伝子を導入することが好ましいことが示された。

【0030】

実施例4

GPCRをコードするRNAを卵母細胞1個あたり10ng導入後、24時間後にG11 α サブユニットとG14 α サブユニットのキメラG α 蛋白質をコードするRNAを1ngまたは10ng導入した。その後、実施例1に記載の方法で、これらの卵母細胞のリガンド応答を測定した。その結果、図8に示すように、キメラG α 蛋白質をコードするRNA量がGPCRをコードするRNA量の10分の1の場合にも応答が確認されたが、キメラG α 蛋白質をコードするRNAをGPCRをコードするRNAと同量の10ng導入した場合の方がリガンドに対する電流応答が明らかに大きかった。

【0031】

図9に、GPCRをコードする遺伝子に対するGq α サブユニットをコードする遺伝子の比率が1:1/10～1:10の場合の電流応答の結果を示す。図9に示すように、Gq α サブユニットをコードする遺伝子の量が、GPCRをコードする遺伝子の量に対し、1/10～10の比であると好ましい。

【0032】

実施例5

以下、本発明の一実施形態について、図10を用いて詳細に説明する。

GPCRをコードするRNA及びキメラG α 蛋白質をコードするRNAを合成する。顧客から供与されたGPCRをコードするDNAを酵素処理し、鋳型を作成する。同時にキメラG α 蛋白質をコードするDNAを酵素処理し、鋳型を作成する。これを基に、GPCRをコードするRNAとキメラG α 蛋白質をコードするRNAをアフリカツメガエル卵

母細胞に共導入する。一定期間培養後、これらの卵母細胞にGPCRのリガンド候補物質を添加し、その際の細胞応答を検出することにより、GPCRのリガンドスクリーニングを行う。

【0033】

【発明の効果】

本発明によりアフリカツメガエル等の動物卵母細胞を用いた外来蛋白質発現系において、本来共役するG蛋白質のサブタイプがいずれであるかに関わらず、GPCRを介したシグナル伝達系の活性をイノシトールリン脂質代謝回転系活性を指標に測定することができる。

【0034】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Hitachi, Ltd.

<120> A method for measuring GPCR using co-expression of G α protein

<130> H300343

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1464

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

atgagcctcc ccaattcctc ctgcctctta gaagacaaga tgtgtgaggg caacaagacc 60
actatggcca gccccagct gatgccctg gtggtggtcc tgagcactat ctgcttggtc 120
acagtagggc tcaacctgct ggtgctgtat gccgtacgga gtgagcggaa gctccacact 180
gtggggaacc tgtacatcgt cagcctctcg gtggcggact tgatcgtggg tgccgtcgtc 240
atgcctatga acatcctcta cctgctcatg tccaagtggc cactgggccg tcctctctgc 300
ctcttttggc tttccatgga ctatgtggcc agcacagcgt ccattttcag tgtcttcac 360
ctgtgcattg atcgctaccg ctctgtccag cagccctca ggtacctta gtatcgtacc 420
aagacccgag cctcggccac cattctgggg gcctggtttc tctcttttct gtgggttatt 480
cccattctag gctggaatca cttcatgcag cagacctcgg tgcgccgaga ggacaagtgt 540
gagacagact tctatgatgt cacctggttc aaggtcatga ctgccatcat caacttctac 600
ctgcccacct tgctcatgct ctggttctat gccaatctt acaaggccgt acgacaacac 660
tgccagcacc gggagctcat caataggtcc ctcccttct tctcagaaat taagctgagg 720
ccagagaacc ccaaggggga tgccaagaaa ccagggaagg agtctccctg ggaggttctg 780
aaaaggaagc caaaagatgc tgggtggtgga tctgtcttga agtcaccatc ccaaaccacc 840
aaggagatga aatccccagt tgtcttcagc caagaggatg atagagaagt agacaaactc 900
tactgctttc cacttgatat tgtgcacatg caggctgcgg cagaggggag tagcaggggac 960
tatgtagccg tcaaccggag ccatggccag ctcaagacag atgagcaggg cctgaacaca 1020
catggggcca gcgagatatc agaggatcag atgttaggtg atagccaatc cttctctcga 1080
acggactcag ataccaccac agagacagca ccaggcaaag gcaaattgag gagtgggtct 1140
aacacaggcc tggattacat caagtttact tggaagaggc tccgctcgca ttcaagacag 1200
tatgtatctg ggttgacat gaaccgcgaa aggaaggccg ccaaacagtt gggttttatc 1260
atggcagcct tcacctctg ctggatccct tatttcacat tcttcattgt cattgccttc 1320
tgcaagaact gttgcaatga acatttgac atgttcacca tctggctggg ctacatcaac 1380
tccacactga accccctcat ctacccttg tgcaatgaga acttcaagaa gacattcaag 1440
agaattctgc atattcgctc ctaa 1464

<210> 2

<211> 1080

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

```
atggcaccca atggcacagc ctcttccttt tgcctggact ctaccgcatg caagatcacc 60
atcacctgtg tccttgcggt cctcatcctc atcacctgtg ctggcaatgt ggtcgtctgt 120
ctggccgttg gcttgaaccg cgggctccgc aacctgacca attgtttcat cgtgtccttg 180
gctatcactg acctgtcctt cggcctcctg gtgctgccct tctctgccat ctaccagctg 240
tcctgcaagt ggagctttgg caaggtcttc tgcaatatct acaccagcct ggatgtgatg 300
ctctgcacag cctccattct taacctcttc atgatcagcc tcgaccggtg ctgcgctgtc 360
atggaccacac tgcggtaccc tgtgctggtc acccagttc gggtcgccat ctctctggtc 420
ttaatttggg tcacttccat taccctgtcc tttctgtcta tccacctggg gtggaacagc 480
aggaacgaga ccagcaaggg caatcatacc acctctaagt gcaaagtcca ggtcaatgaa 540
gtgtacgggc tgggtgatgg gctggtcacc ttctacctcc cgctactgat catgtgcatc 600
acctactacc gcactttcaa ggtcgcccgg gatcaggcca agaggatcaa tcacattagc 660
tcctggaagg cagccaccat cagggagcac aaagccacag tgacactggc cgccgtcatg 720
ggggccttca tcactgtctg gtttccttac ttaccgcgt ttgtgtaccg tgggctgaga 780
ggggatgatg ccatcaatga ggtgttagaa gccatcgttc tgtggctggg ctatgccaac 840
tcagccctga accccatcct gtatgctgcg ctgaacagag acttccgcac cgggtaccaa 900
cagctcttct gctgcaggct ggccaaccgc aactcccaca aaacttctct gaggtccaac 960
gcctctcagc tgtccaggac ccaaagccga gaaccaggc aacaggaaga gaaaccctg 1020
aagctccagg tgtggagtgg gacagaagtc acggccccc agggagccac agacaggtaa 1080
```

【図面の簡単な説明】

【図 1】

本発明において用いるGq α サブユニットキメラ蛋白質の例を示す。

【図 2】

イノシトールリン脂質代謝回転系の模式図を示す。

【図 3】

本発明の外来蛋白質発現卵母細胞の作製及びそれを用いたリガンドのスクリーニング方法について模式的に示す。

【図 4】

リガンド刺激によるCaイオン濃度依存性Cl電流応答の有無に対するキメラG蛋白質の共発現の影響を示す。

【図 5】

キメラG蛋白質共発現卵母細胞における電流応答に対するリガンド濃度の影響を示す。

【図 6】

キメラGq α サブユニットをコードする遺伝子をGPCRをコードする遺伝子と同時に導入した卵母細胞と24時間後に導入した卵母細胞における電流応答の例を示す。

【図 7】

GPCRをコードする遺伝子導入後0～42時間後にGq α サブユニットをコードする遺伝子を導入した場合の電流応答の結果を示す。

【図 8】

キメラG α 蛋白質をコードする遺伝子をGPCRをコードする遺伝子と同量導入した卵母細胞と10分の1量を導入した卵母細胞における電流応答の例を示す。

【図 9】

GPCRをコードする遺伝子に対するGq α サブユニットをコードする遺伝子の比率の電流応答に対する影響を示す。

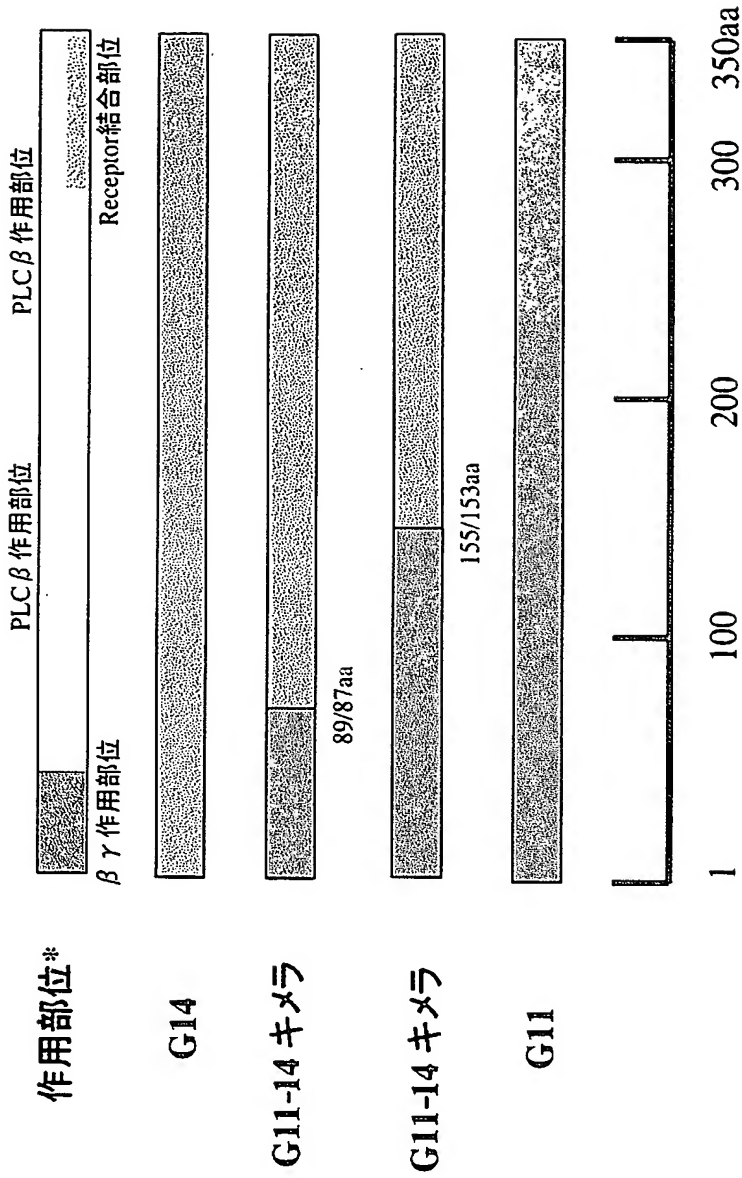
【図 10】

顧客の要請によってリガンドスクリーニングサービスを行う場合について示す。

【書類名】 図面

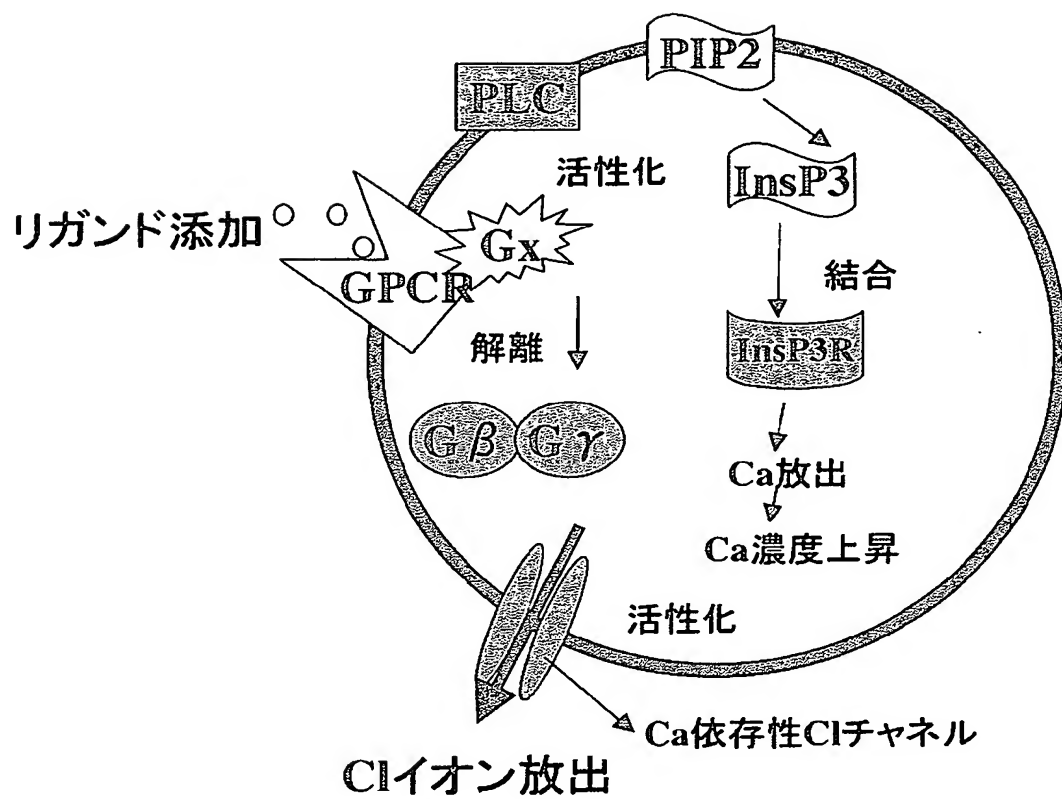
【図 1】

図 1



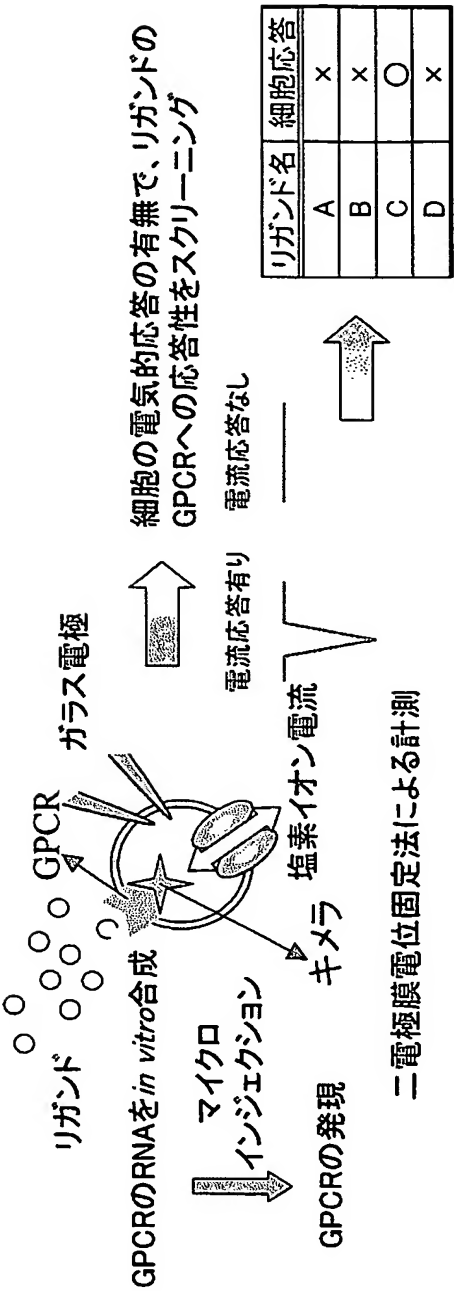
【図2】

図2



【図3】

図3



二電極膜電位固定法による計測
GPCR活性化に伴う細胞内Ca濃度依存性
塩素イオンチャネルの開口による電流変化を計測

解析データ(模式図)

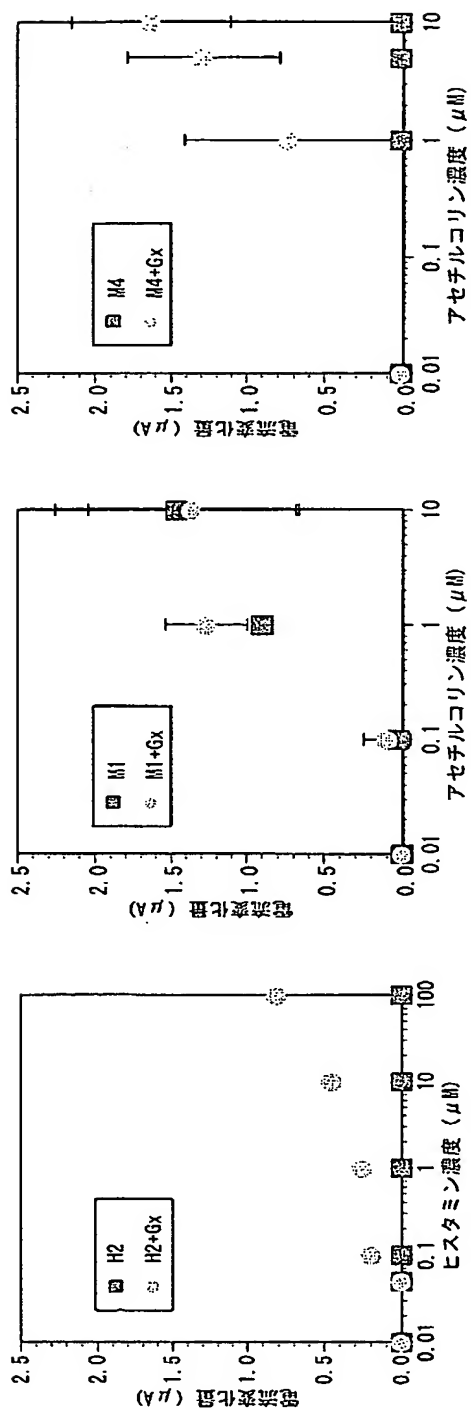
【図 4】

図 4

GPCR	結合 G α	リガンド	共発現	
			なし	あり
H1	Gq	ヒスタミン	○	○
H2	Gs	ヒスタミン	×	○
M1	Gq	アセチルコリン	○	○
M2	Gi	アセチルコリン	×	○
M3	Gq	アセチルコリン	○	○
M4	Gi	アセチルコリン	×	○
M5	Gq	アセチルコリン	○	○
δ オピオイド	Gi	Leu-Enk	×	○
mGlu1	Gq	グルタミン酸	○	○

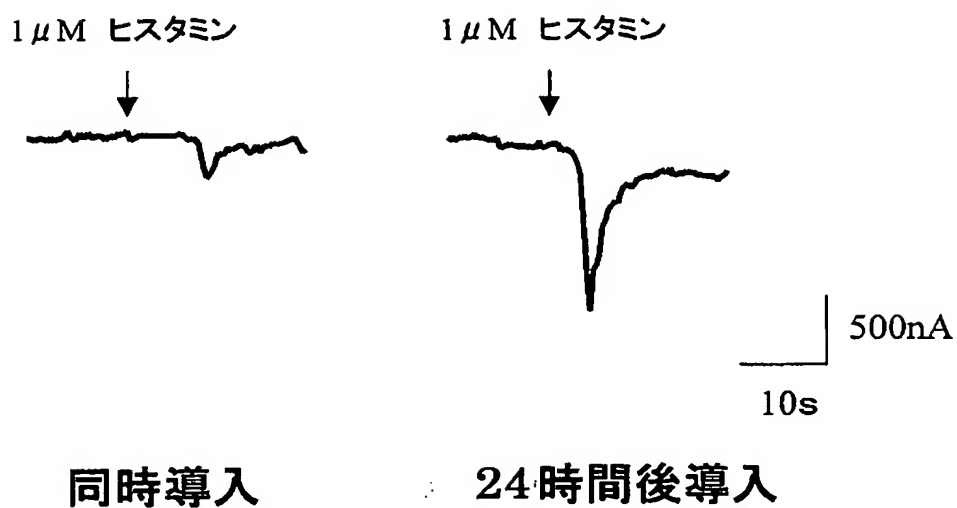
【図5】

1 2 3



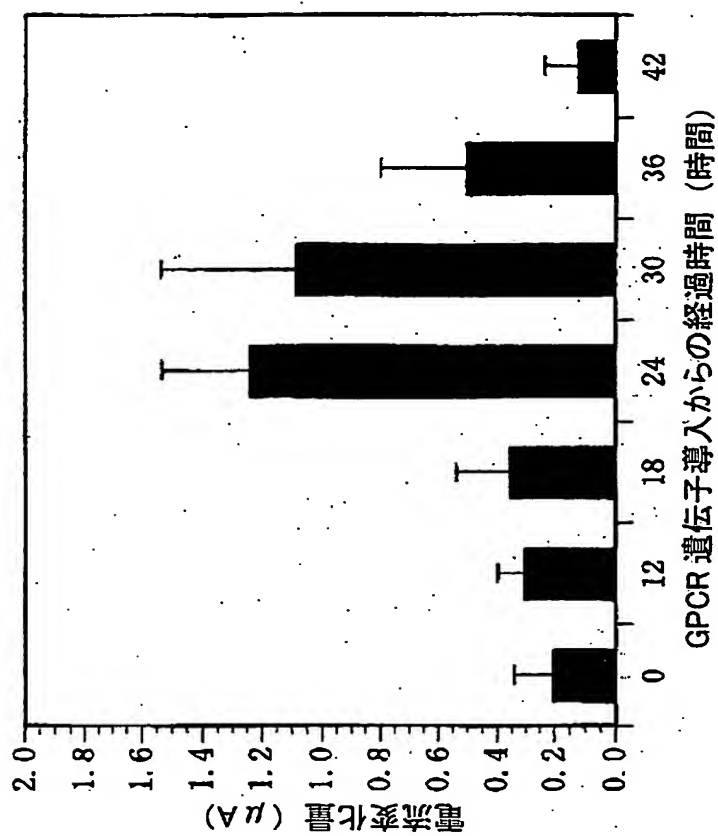
【図 6】

図6



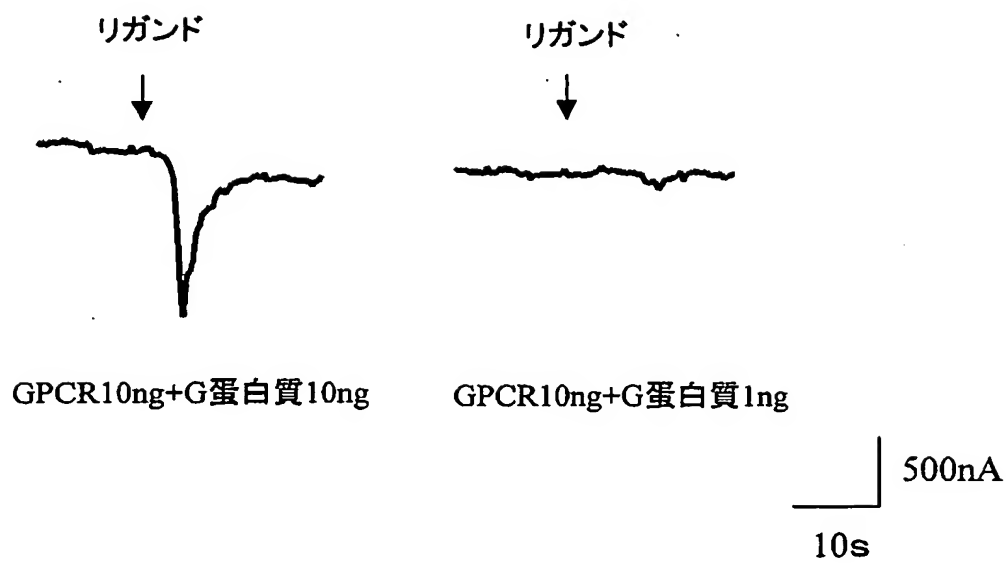
【図 7】

図7



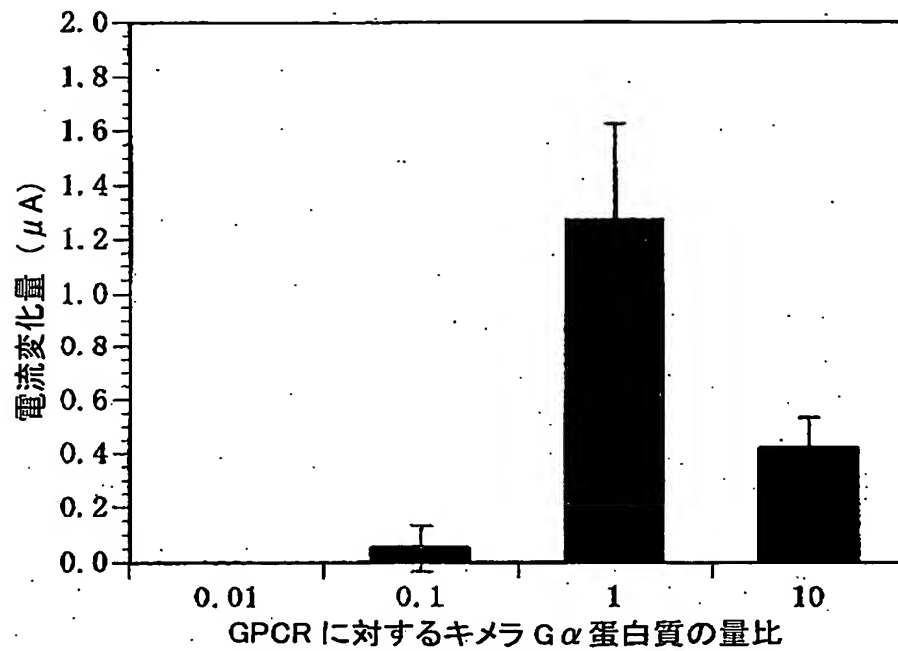
【図 8】

図 8



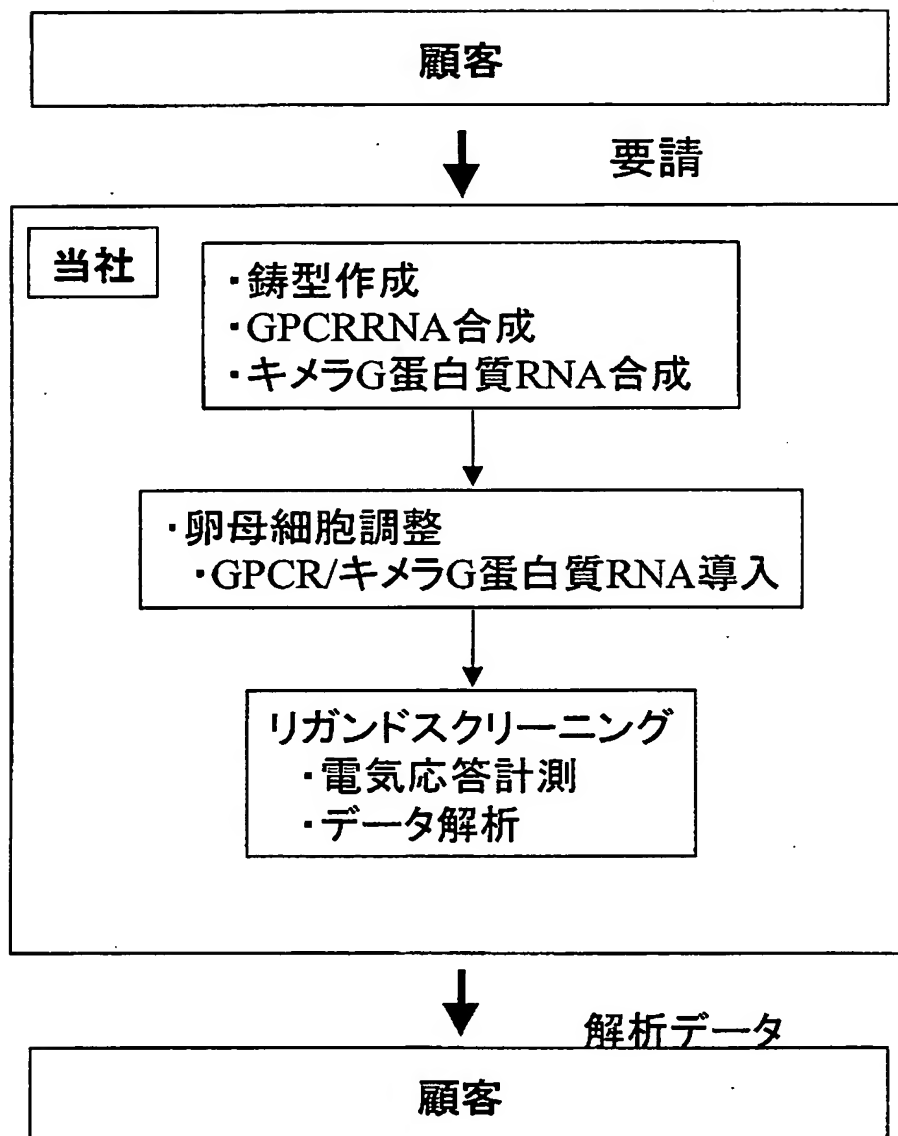
【図 9】

図 9



【図10】

図10



【書類名】 要約書

【要約】

【解決手段】 メスアフリカツメガエルから摘出し、定法で選別した卵母細胞に GPCR をコードする RNA 及び G_{11} または G_q と G_{14} 、 G_{15} または G_{16} のキメラ G 蛋白質をコードする RNA を共導入する。RNA 導入後、通常の期間培養した卵母細胞にリガンド候補物質を添加し、活性を測定する。

【効果】 本法を用いれば、1つの測定方法でリガンドか否かを判断することが可能である。本発明は、機能未知の GPCR のリガンドを同定する際の測定方法を単純化・高速化することができる。

【選択図】 図 1

特願 2 0 0 3 - 1 7 0 0 3 2

出 願 人 履 歷 情 報

識別番号

[0 0 0 0 0 5 1 0 8]

1 . 変 更 年 月 日

1 9 9 0 年 8 月 3 1 日

[変 更 理 由]

新 規 登 録

住 所

東 京 都 千 代 田 区 神 田 駿 河 台 4 丁 目 6 番 地

氏 名

株 式 会 社 日 立 製 作 所